
กายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้งของสาकुในประเทศไทย

Anatomy of Starch Granules of Arrowroot in Thailand

อัปสร วิทยาประภารัตน์^{1/} และ เกศินี ระมิงค์วงศ์^{1/}

Absorn Wittayapraparat^{1/} and Kesinee Ramingwong^{1/}

Abstract : Thirteen accessions of arrowroots, i.e. Sakhu Wilat 1-9 (*Maranta arundinacea* L.), Sakhu Dang (variegated Sakhu) (*Maranta arundinacea variegata* Hort.) of Marantaceae and Sakhu Chin 1-3 (*Canna edulis* Ker-Gawler) of Cannaceae were studied. Anatomy of starch granules showed 2 different groups. The granules with oval-shaped, centric hilum and size of 6-250 micrometres were found in Sakhu Wilat 1-9 and Sakhu Dang while the granules with wedge-shaped, eccentric hilum and sizes of 12-325 micrometres were found in Sakhu Chin 1-3.

Keywords : arrowroot, starch granule, anatomy of starch granule

บทคัดย่อ : ทำการศึกษาสาकु 13 ตัวอย่าง คือ สาकुวิลาส 1-9 (*Maranta arundinacea* L.) สาकुต่าง (*Maranta arundinacea variegata* Hort.) ในวงศ์ Marantaceae และสาकुจิ้น 1-3 (*Canna edulis* Ker-Gawler) ในวงศ์ Cannaceae พบว่า กายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้งแตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สาकुวิลาส 1-9 และสาकुต่าง เม็ดแป้งรูปไตหรือรีแกมไข่ ศูนย์กลางการเจริญอยู่เกือบกึ่งกลาง มีความยาวเฉลี่ย 6-250 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สาकुจิ้น 1-3 เม็ดแป้งรูปร่างคล้ายเกล็ดหรือลิ้ม ศูนย์กลางการเจริญอยู่ริมของปลายด้านหนึ่ง มีความยาวเฉลี่ย 12-325 ไมโครเมตร

คำสำคัญ : สาकु เม็ดแป้ง กายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้ง

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

สาหร่าย หรือต้นรากสาหร่าย (arrowroot) เป็นพืชล้มลุกประเภทหัว พบทั่วไปตามเขตร้อน และเขตอบอุ่นของโลก ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีปลูกอยู่ทั่วไป สำหรับประเทศไทย เป็นพืชป่าที่นำมาปลูกเป็นผักพื้นบ้านในลักษณะผักสวนครัว (นายเกษตร, 2544) เป็นพืชระดับล่างที่สามารถปลูกร่วมกับพืชอื่นได้ เจริญเติบโตรวดเร็ว มีอายุปลูกสั้น สามารถเจริญเติบโตได้ตลอดทั้งปี ปลูกเลี้ยงง่าย ปรับตัวเข้ากับดินและสภาพแวดล้อมต่างๆ และทนต่อร่มเงาได้ดี (พิมล และคณะ, 2542) เหน้าให้ผลผลิตคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้ง แป้งที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงและมีคุณภาพดี (Thai Junior Encyclopedia Project, 2000) จึงมีแนวโน้มในการผลิตเป็นอาหารสำรองได้ในอนาคต แต่ปัจจุบันการผลิตและการใช้ประโยชน์ยังมีค่อนข้างจำกัด พบเห็นและรู้จักน้อย ปลูกกันในวงแคบไม่แพร่หลาย ไม่นิยมนำมารับประทาน หรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ทำให้บทบาทของสาหร่ายในประเทศไทยมีน้อย การศึกษาข้อมูลจากพืชในกลุ่มสาหร่ายเพิ่มมากขึ้นจะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มศักยภาพ และได้ประโยชน์จากการใช้มากยิ่งขึ้น เพื่อให้เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการเกษตร และเป็นแนวทางในการศึกษาทบทวนพืชชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์ และวิธีการ

ศึกษาองค์ประกอบของเม็ดแป้ง (starch granule) ในเหง้าของสาหร่าย ในช่วงการเจริญเติบโตระยะต่าง ๆ ทำการย่อยสลาย วัดขนาดเม็ดแป้ง เปรียบเทียบ และบันทึกภาพ โดยใช้ตัวอย่างพืชที่รวบรวมมาจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย และนำไปปลูกรวบรวมในกระถาง รวม 13 ตัวอย่าง (accession) ได้แก่ สาหร่ายวิลาส 4 ตัวอย่าง สาหร่ายต่าง 1 ตัวอย่าง และสาหร่ายจีน 1 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ สาหร่ายวิลาส 1 ตัวอย่าง และสาหร่ายจีน 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดจันทบุรี สาหร่ายวิลาส 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดชลบุรี สาหร่ายวิลาส 1 ตัวอย่าง จากจังหวัดสระแก้ว และสาหร่ายวิลาส 1 ตัวอย่าง

จากจังหวัดนครนายก ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ 1 จังหวัดภาคเหนือ 3 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ 1 จังหวัดภาคกลาง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างเหง้า

ขุดและตัดเก็บเอาเฉพาะส่วนเหง้าของสาหร่าย จากกระถางหลังปลูกทุกๆ สัปดาห์ จนกระทั่งเหง้าเจริญเติบโต และมีการพัฒนาเต็มที่ ล้างน้ำทำความสะอาดเอาเศษดินออก ผ่าเหง้าสาหร่ายออกตามยาว แล้วบันทึกภาพไว้

2. การเตรียมสไลด์เม็ดแป้ง

ใช้ปลายมีดขูดเนื้อเยื่อบริเวณกึ่งกลางของเหง้า ไล่จากปลายถึงโคนที่ละน้อย นำเนื้อเยื่อที่ได้มาวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไอโอดีน (คณาจารย์ภาควิชาเคมี, 2523) เข้มข้น 2% ลงบนเนื้อเยื่อ 1-2 หยด ใช้ด้ามเข็มเย็บเย็บให้เม็ดแป้งหลุดออกจากเนื้อเยื่อ คีบเอาเศษเนื้อเยื่อที่เหลือทิ้งไป วางแผ่นปิดสไลด์ปิดทับลงไป

3. การบันทึกข้อมูล

นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้ง บันทึกข้อมูลลักษณะ และวัดขนาดของเม็ดแป้งเป็นค่าเฉลี่ยความยาว (ค่าต่ำสุด-สูงสุด) เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยไล่ตำแหน่งของเนื้อเยื่อในเหง้า บันทึกภาพ และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากทุกระยะการเจริญเติบโต

ผลการทดลอง

การศึกษาพบว่าโครงสร้างภายในเหง้าสาหร่าย มีเม็ดแป้งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยเม็ดแป้งสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อพาเรงคิมา (ภาพที่ 1) มีลักษณะ และขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สาหร่ายวิลาส 1-9 และสาหร่ายต่าง ในวงศ์ Marantaceae มีลักษณะและขนาดของเม็ดแป้งคล้ายคลึงกันแบบหนึ่ง และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ สาหร่ายจีน 1-3 ในวงศ์ Cannaceae มีลักษณะ และขนาดของเม็ดแป้งคล้ายคลึงกันเช่นกันอีกแบบหนึ่ง จึงเสนอผลการศึกษาไว้ร่วมกัน ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

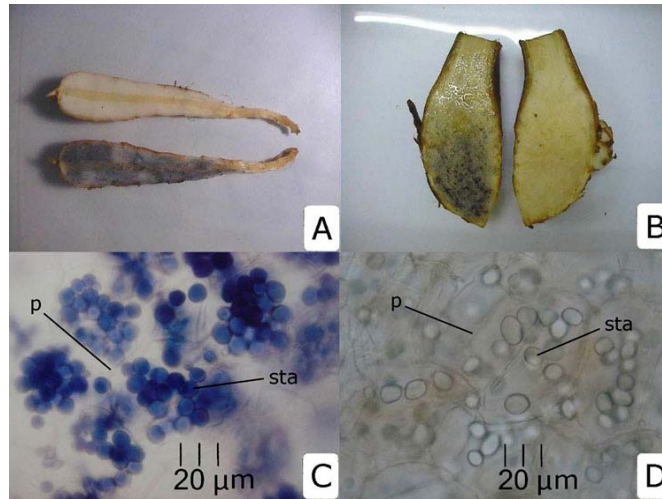


Figure 1 Internal structure of arrowroot rhizome.

- A = Arrowroot rhizome of Marantaceae
 B = Arrowroot rhizome of Cannaceae
 C = Starch granules in parenchyma of arrowroot in Marantaceae
 D = Starch granules in parenchyma of arrowroot in Cannaceae
 p = parenchyma, sta = starch granule

1. สาขวงศ์ Marantaceae

เม็ดแป้งมีลักษณะเป็นเม็ดเดี่ยว ๆ รูปร่างไม่แน่นอน ส่วนมากเป็นรูปไต หรือรูปรีแกมไข่ มีศูนย์กลางการเจริญ (hilum) เป็นจุดคล้ายดาว อยู่ประมาณเกือบกึ่งกลาง ผิวเม็ดไม่เรียบมีรอยเป็นชั้น ๆ (lamella) การทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ดังภาพที่ 2

ในช่วงการเจริญเติบโตระยะต่าง ๆ เม็ดแป้งภายในเหง้ามีการเปลี่ยนแปลงควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเหง้า โดยจะมีขนาดใหญ่มากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเหง้าเพิ่มการเจริญเติบโต และเมื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบขนาด พบว่า สามารถแบ่งระยะการเปลี่ยนแปลงของขนาดเม็ดแป้งโดยรวมได้ 8 ระยะด้วยกัน (ภาพที่ 3) คือ

ระยะที่ 1 เม็ดแป้งมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 8.67 (6-12) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อเจริญส่วนที่เริ่มพัฒนาของเหง้า

ระยะที่ 2 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่มากขึ้น ความยาวเฉลี่ย 13.93 (10-25) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อส่วนที่ยังอ่อนของเหง้า

ระยะที่ 3 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่มากขึ้น ความยาวเฉลี่ย 36.67 (25-50) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อส่วนที่ยังอ่อนของเหง้า

ระยะที่ 4 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่มากขึ้น ความยาวเฉลี่ย 58.27 (38-100) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยังมีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเหง้า

ระยะที่ 5 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 73.53 (50-112) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยังมีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเหง้า

ระยะที่ 6 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 96.33 (65-125) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยังมีการเจริญเติบโตของเหง้า

ระยะที่ 7 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 116.87 (60-150) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยังมีการเจริญเติบโตของเหง้า

ระยะที่ 8 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 159.27 (75-250) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่หยุดการเจริญเติบโตแล้ว

เหง้าในช่วงการเจริญเติบโตระยะต่างๆ มักมีระยะการเปลี่ยนแปลงของขนาดเม็ดแป้งมากกว่าหนึ่งระยะ จากการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อภายในเหง้าที่ไม่พร้อมกัน (ภาพที่ 4) และพบว่า มีเม็ดแป้งระยะที่ 1 ในเหง้าที่เริ่มพัฒนาขึ้นหลังปลูก 10-26 สัปดาห์ ที่บริเวณปลายของ

เหง้า และเม็ดแป้งมีการสร้างขยายขนาดไปเรื่อยๆ จนสัปดาห์ที่ 30 เม็ดแป้งเริ่มมีขนาดใหญ่เต็มที่ และไม่มีการสร้างเม็ดแป้งที่ปลายเหง้าเพิ่มอีก ในสัปดาห์ที่ 34 เม็ดแป้งภายในเหง้าจึงเจริญเติบโตเต็มที่ทั้งเหง้า และมีขนาดไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งที่ปลายเหง้าสร้างยอดต้นใหม่

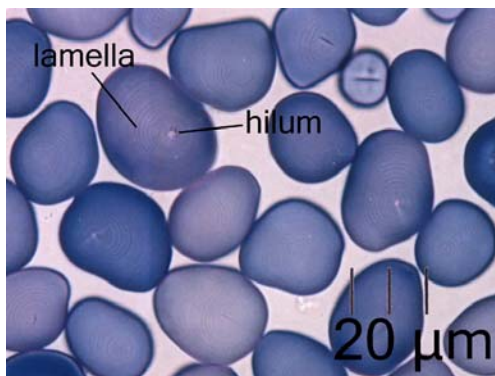


Figure 2 Characteristics of starch granules in arrowroot (Marantaceae).

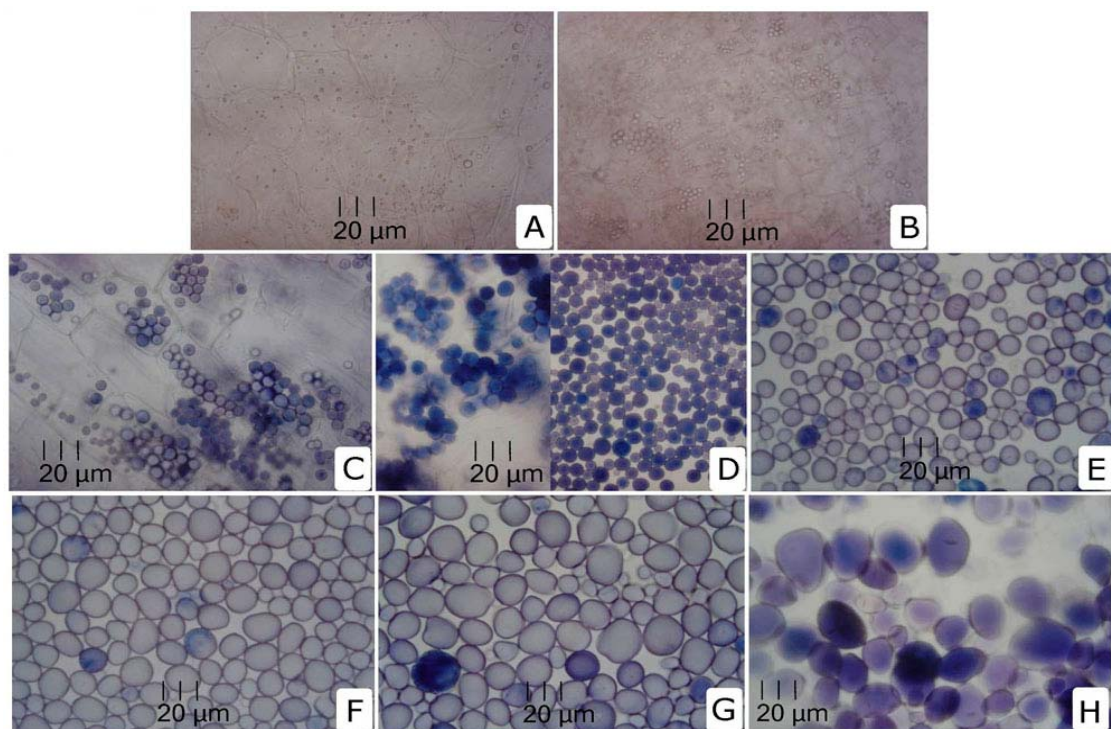
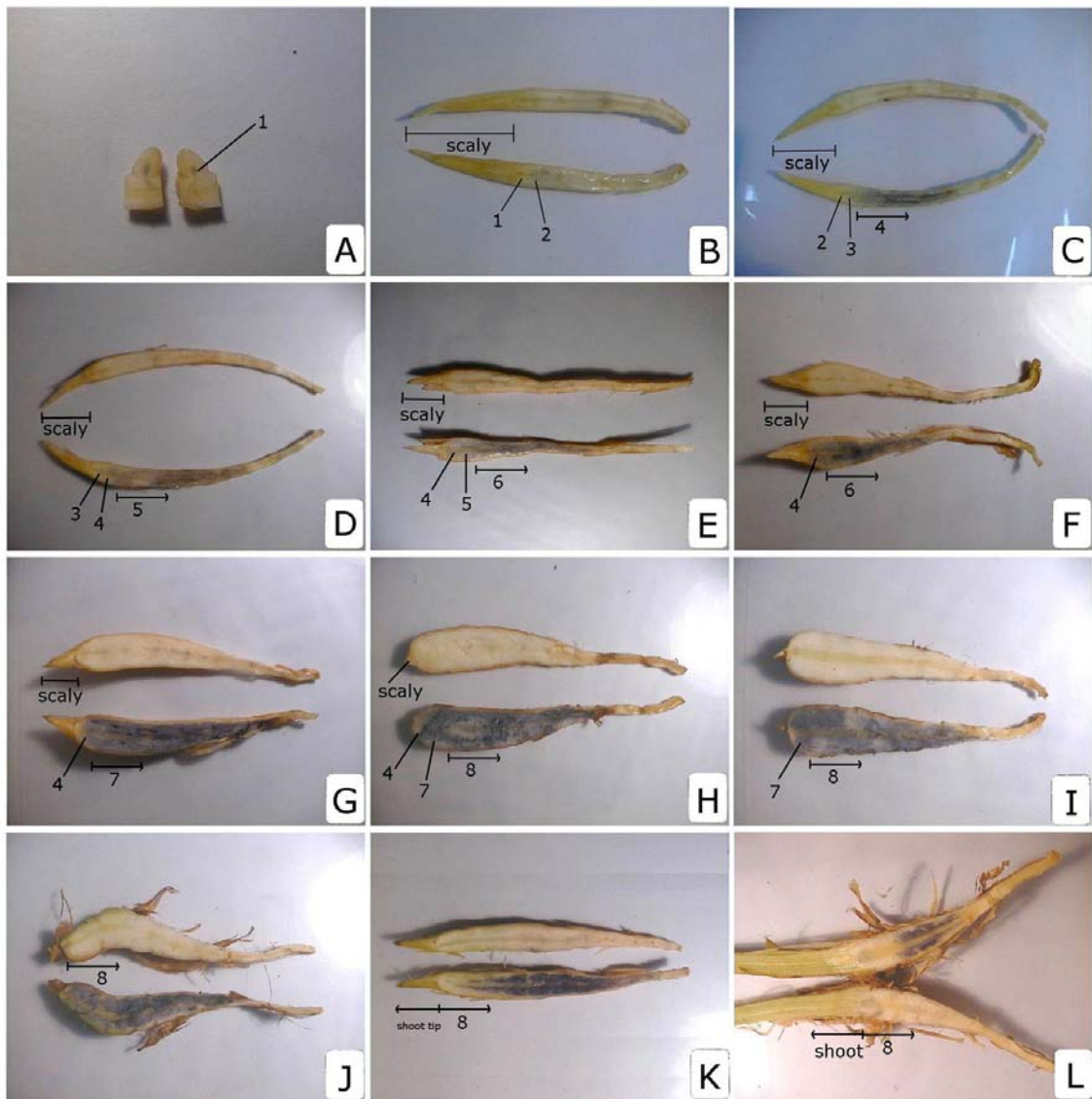


Figure 3 Transformation size of starch granules in arrowroot (Marantaceae).

A= stage 1 B= stage 2 C= stage 3 D= stage 4 E= stage 5 F= stage 6 G= stage 7 H= stage 8



stage of growth A = 10 weeks B = 14 weeks C = 16 weeks D = 18 weeks E = 20 weeks F = 22 weeks G = 24 weeks H = 26 weeks I = 30 weeks J = 34 weeks K = 40 weeks L = 44 weeks Position of starch granules 1 = stage 1 2 = stage 2 3 = stage 3 4 = stage 4 5 = stage 5 6 = stage 6 7 = stage 7 8 = stage 8

Figure 4 Position of starch granules in different stage of growth in arrowroot (Marantaceae).

2. สาควงศ์ Cannaceae

เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับเม็ดแป้งในสาควงศ์ Marantaceae ลักษณะเป็นเม็ดเดี่ยว ๆ รูปร่างคล้ายเกล็ด หรือรูปลิ้ม มีศูนย์กลางการเจริญ (hilum) เป็นจุดเล็กๆ อยู่ริมของปลายด้านหนึ่ง ผิวเม็ดไม่เรียบ และมีรอยเป็นชั้นๆ (lamella) การทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน แต่ติดสีจางกว่าเม็ดแป้งในสาควงศ์ Marantaceae ดังภาพที่ 5

ในช่วงการเจริญเติบโตระยะต่าง ๆ เม็ดแป้งภายในเหง้ามีการเปลี่ยนแปลงควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเหง้า โดยจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเหง้าเพิ่มการเจริญเติบโต และเมื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบขนาดพบว่า สามารถแบ่งระยะการเปลี่ยนแปลงของขนาดเม็ดแป้งโดยรวมได้ 8 ระยะด้วยกัน (ภาพที่ 6) คือ

ระยะที่ 1 เม็ดแป้งมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็ก มีความยาวเฉลี่ย 25.47 (12-50) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อเจริญส่วนที่เริ่มพัฒนาของเหง้า

ระยะที่ 2 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ขึ้น ความยาวเฉลี่ย 79.33 (45-125) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อส่วนที่ยังอ่อนของเหง้า

ระยะที่ 3 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ขึ้น ความยาวเฉลี่ย 159.00 (100-225) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อส่วนที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเหง้า

ระยะที่ 4 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 263.33 (175-335) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยัง

มีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเหง้า

ระยะที่ 5 เม็ดแป้งมีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 379.67 (200-525) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่ยังมีการเจริญเติบโตของเหง้า

ระยะที่ 6 เม็ดแป้งมีขนาดไม่เปลี่ยนแปลงขนาดมากนัก ความยาวเฉลี่ย 372.73 (175-525) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่หยุดการเจริญเติบโตแล้ว

ระยะที่ 7 เม็ดแป้งมีขนาดเล็กลง และเริ่มเหี่ยว ความยาวเฉลี่ย 228.80 (115-375) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่เริ่มแก่

ระยะที่ 8 เม็ดแป้งมีขนาดเล็กลง และเหี่ยวมากขึ้น ความยาวเฉลี่ย 217.33 (125-325) ไมโครเมตร เป็นเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อที่แก่มากแล้ว เหง้าในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ มักมีระยะการเปลี่ยนแปลงของขนาดเม็ดแป้งมากกว่าหนึ่งระยะ จากการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อภายในเหง้าที่ไม่พร้อมกัน (ภาพที่ 7) และพบว่า มีเม็ดแป้งระยะที่ 1 เหง้าที่เริ่มพัฒนาขึ้นหลังปลูก 2-6 สัปดาห์ เป็นช่วงก่อนการสร้างใบ ซึ่งน่าจะมีการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ และเม็ดแป้งขึ้นเพียงในช่วงเวลา 4 สัปดาห์นี้เท่านั้น หลังจากสัปดาห์ที่ 6 เป็นระยะการขยายขนาดของเม็ดแป้ง จนถึงสัปดาห์ที่ 18 เม็ดแป้งภายในเหง้าเป็นระยะที่ 6 คือ หยุดขยายขนาด และโตเต็มที่ ซึ่งเป็นการสร้างช่อดอก เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 32 เม็ดแป้งเข้าสู่ระยะที่ 7 คือเริ่มแก่และเหี่ยวแล้ว

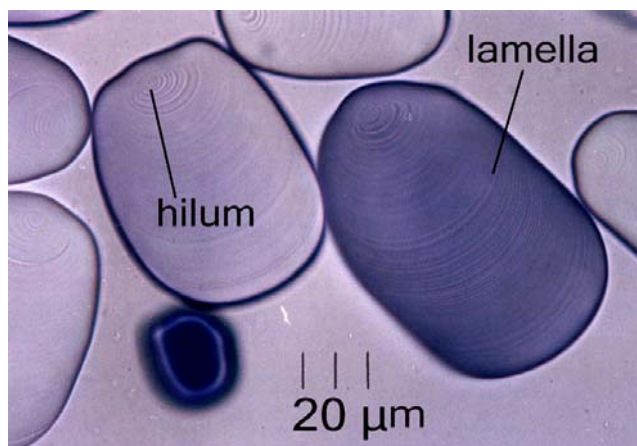


Figure 5 Characteristics of starch granules in arrowroot (Cannaceae).

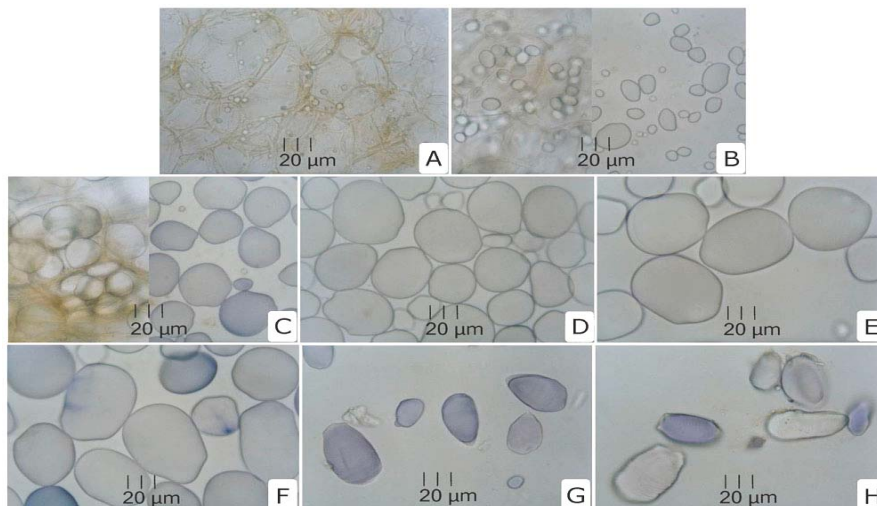
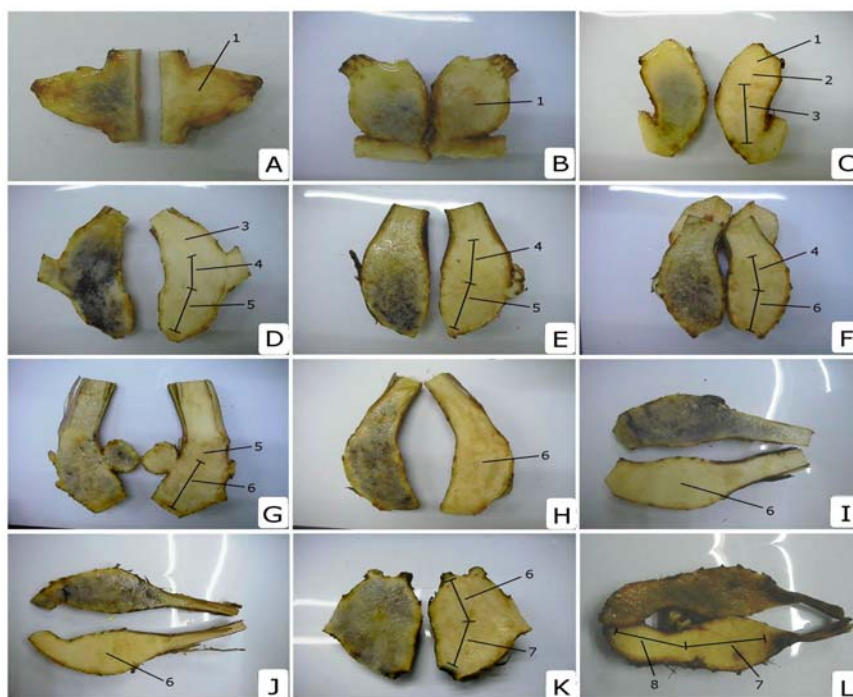


Figure 6 Transformation size of starch granules in arrowroot (Cannaceae).

A= stage 1 B= stage 2 C= stage 3 D= stage 4 E= stage 5 F= stage 6

G= stage 7 H= stage 8



stage of growth A = 2 weeks B = 4 weeks C = 6 weeks D = 8 weeks E = 10 weeks F =

12 weeks G = 14 weeks H = 18 weeks I = 24 weeks J = 28 weeks K = 32 weeks L =

40 weeks Position of starch granules 1 = stage 1 2 = stage 2 3 = stage 3 4 =

stage 4 5 = stage 5 6 = stage 6 7 = stage 7 8 = stage 8

Figure 7 Position of starch granules in different stage of growth in arrowroot (Cannaceae).

วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อพิจารณากายวิภาคศาสตร์ของเมล็ดแบ่งร่วมกับการเจริญเติบโต พบว่า ในสาकुวงศ์ Marantaceae เมล็ดแบ่งมีขนาดโตเต็มที่ทั้งเหง้า ในช่วงอายุ 34 สัปดาห์ หรือ 8 เดือนครึ่ง และในสาकुวงศ์ Cannaceae เมล็ดแบ่งมีขนาดโตเต็มที่ทั้งเหง้า ในช่วงอายุ 18 สัปดาห์ หรือ 4 เดือนครึ่ง ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บเกี่ยวเหง้าที่สุด ควรเป็นช่วงอายุนี้ด้วยจึงจะได้เมล็ดแบ่งสาकुที่มีคุณภาพทั้งเหง้า ซึ่งใกล้เคียงกับที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2544) ที่รายงานว่า สาकुวงศ์ Marantaceae พร้อมเก็บเกี่ยวหลังปลูก 8-12 เดือน สาकुวงศ์ Cannaceae สามารถเก็บเกี่ยวเมื่อต้นมีอายุ 6-8 เดือน หรือขึ้นกับสภาพแวดล้อม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกรที่เพาะปลูก และเก็บเกี่ยวผลผลิต

สรุปผลการทดลอง

กายวิภาคศาสตร์ของเมล็ดแบ่ง แตกต่างกัน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สาकुวิลาส และสาकुต่าง เมล็ดแบ่งรูปไตหรือรีแกมไข่ ศูนย์กลางการเจริญอยู่เกือบกึ่งกลาง มีความยาวเฉลี่ย 6-250 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สาकुจีน เมล็ดแบ่งรูปร่างคล้ายเกล็ดหรือลิ้ม ศูนย์กลางการเจริญอยู่ริมของปลายด้านหนึ่ง มีความยาวเฉลี่ย 12-325 ไมโครเมตร

เอกสารอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาเคมี. 2523. คู่มือเตรียมปฏิบัติการเคมี. หน่วยพิมพ์ออฟเซต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 373 น.
- นายเกษตร. 2544. สมุนไพรไม้ประดับหายาก เล่ม 3. แปลน ฟรันทิง, กรุงเทพฯ. 255 น.
- พิมล เทียงธรรม, สุदारัตน์ ตริเพชรกุล และผ่องเพ็ญ จิตอารีรัตน์. 2542. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เหง้าของพุทธรักษาгинได้ (*Canna edulis* Ker.) เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้ง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.kmutt.ac.th/organization/Research/Intellect/pro419.htm> (11 กรกฎาคม 2546).
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2544. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 9 พืชที่ให้คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เมล็ด. สหมิตรฟรันทิง, นนทบุรี. 301 น. แปลจาก Flach, M. and F. Rumawas (ed.). 1996. Plant Resources of South-East Asia 9 : Plants Yielding Non-seed Carbohydrates. Backhuys Publishers, Leiden. 237 p.
- Thai Junior Encyclopedia Project. 2000. พืชหัว. [Online]. Available <http://kanchanapisak.or.th/kp6/Book5/Chapter5/t5-5-16.htm>. (28 May 2003).